

WEST**End of Result Set**

Generate Collection

L1: Entry 2 of 2

File: DWPI

May 22, 1997

DERWENT-ACC-NO: 1997-281986

DERWENT-WEEK: 199726

COPYRIGHT 2000 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Enzymatic catalysis of reduction and conversion of di:sulphide bridges in proteins - using redox equivalents from microorganisms, and application in improving quality of foods

INVENTOR: FISCHER, H

PATENT-ASSIGNEE:

ASSIGNEE

CODE

FISCHER H

FISCI

PRIORITY-DATA:

1995DE-1041846

November 9, 1995

PATENT-FAMILY:

PUB-NO

PUB-DATE

LANGUAGE

PAGES

MAIN-IPC

DE 19541846 A1

May 22, 1997

N/A

003

A23L001/03

APPLICATION-DATA:

PUB-NO

APPL-DESCRIPTOR

APPL-NO

APPL-NO

DE19541846A1

November 9, 1995

1995DE-1041846

N/A

INT-CL (IPC): A21D 2/26; A21D 8/04; A23L 1/03; A23L 1/105

ABSTRACTED-PUB-NO: DE19541846A

BASIC-ABSTRACT:

In the enzymatic catalysis of the reduction and conversion of disulphide bridges in proteins, the redox equivalents are obtained from microorganism s.

USE - The process can be applied in production of many foods containing proteins with disulphide bridges, e.g. wheat and other cereal flour, rice and soya beans, in preparation of, e.g. bread, ang-kak, tempeh, natto and tofu, and in processing milk, e.g. to yoghurt and cheese.

ADVANTAGE - The change in quality of foods as accelerated and more complete and a cheap alternative to the NAPD/thioredoxin system is provided. The content of allergenic substances is reduced. Bread dough with better properties is obtained.

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/0

TITLE-TERMS: ENZYME CATALYST REDUCE CONVERT DI SULPHIDE BRIDGE PROTEIN REDOX EQUIVALENT MICROORGANISM APPLY IMPROVE QUALITY FOOD

DERWENT-CLASS: D13 D16

CPI-CODES: D03-F01; D03-F02; D05-A02;

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: C1997-090826

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift
10 DE 195 41 846 A 1

21 Aktenzeichen: 195 41 846.8
22 Anmeldetag: 9. 11. 95
43 Offenlegungstag: 22. 5. 97

51 Int. Cl. 6:
A 23 L 1/03
A 23 L 1/105
A 21 D 2/26
A 21 D 8/04
// (C12N 9/02, C12R
1:19) (C12N 1/18,
C12R 1:865) A23L
1/20, A23C 9/12,
19/032

DE 195 41 846 A 1

71 Anmelder:
Fischer, Heinrich, Dr., 93437 Furth, DE

72 Erfinder:
gleich Anmelder

54 Enzymatische Katalyse der Umlagerung von Disulfidbrücken in Proteinen

57 Die vorliegende Erfindung betrifft die Zugabe von Enzymen der Gruppe der Oxidoreduktasen zu Proteinen, um die Disulfidbrücken der Proteine umzulagern, wobei die Redoxäquivalente von Mikroorganismen bereitgestellt werden.

DE 195 41 846 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Zugabe von Enzymen der Gruppe der Oxidoreduktasen zu Proteinen, um die Disulfidbrücken der Proteine umzulagern, wobei die Redoxäquivalente von Mikroorganismen bereitgestellt werden.

Stand der Technik

Lebensmittel beinhalten Proteine, die im oxidierten Zustand nachteilig auf die Qualität der Lebensmittel wirken. Einige dieser Proteine verursachen bei einem steigenden Anteil der Bevölkerung Allergien. Die Qualität der Lebensmittel kann verbessert werden, wenn als Zusatz die Komponenten des NADP/Thioredoxinsystems zugegeben werden. Thioredoxin reduziert disulfidhaltige Proteine, wie z. B. die stark allergenen α -Amylase- und Trypsininhibitoren, Gliadine und Glutenine. Bei Zugabe des NADP/Thioredoxinsystems zu proteinhaltigen Lebensmitteln, z. B. Weizen-, Reis- und Maismehl, werden die Proteine einer Reihe von Disulfidaustauschreaktionen unterworfen, die zur Reduktion der Cystine bzw. zur Umlagerung zu neuen Disulfidbrücken führen, was zur Ausformung eines neuen Proteinnetzwerks führt und dadurch die Qualität des Produkts verbessert (Buchanan, B. B., Schürmann, P., Decottignies, P. und Lozano, R., Archives of Biochemistry and Biophysics (1994), 257–260). Zur allgemeinen Anwendung ist das NADP/Thioredoxinsystem wegen der hohen Kosten zur Herstellung von NADP und seiner geringen Verfügbarkeit nicht geeignet.

In vielen gebräuchlichen lebensmitteltechnologischen Prozessen können nur hochwertige Ausgangsmaterialien verwendet werden, die unter anderem einen geringeren Anteil an disulfidverbrückten Proteinen aufweisen als minderwertige Ausgangsmaterialien. Wie oben erwähnt, bewirkt die Reduzierung bzw. Umlagerung von Disulfidbrücken eine Verbesserung der Qualität der Lebensmittel.

Die vorliegende Erfindung bezweckt die Bereitstellung eines geeigneten Systems zur Reduzierung bzw. Umlagerung von Disulfidbrücken in Proteinen. Dieses System führt zu einer Beschleunigung der Qualitätsveränderung von z. B. Lebensmitteln und stellt eine verwirklichtbare und kostengünstige Alternative zum NADP/Thioredoxinsystem dar.

Beschreibung der Erfindung

Die genannte Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst, indem auf die zu bearbeitenden Lebensmittel eine geeignete Oxidoreduktase wirkt, wobei Mikroorganismen die Redoxäquivalente zur Verfügung stellen.

Die Erfindung ermöglicht durch die Anwendung von geeigneten Oxidoreduktasen und Mikroorganismen eine Befriedigung des bestehenden Bedürfnisses zur einfachen und kostengünstigen Verbesserung der Qualität von Lebensmitteln und die Verminderung der darin enthaltenen allergenen Stoffe.

Beispielsweise werden bei der Hefeteigherstellung neben vielen anderen Stoffen wie Geschmacksstoffen, Kohlendioxid und Ethanol sozusagen als "Nebeneffekt" auch Redoxäquivalente (Cystein, Glutathion) aus den Hefezellen während der Gärung ausgeschieden, was zur teilweisen Reduzierung bzw. Umlagerung der Disulfidbrücken von Gluten, dem wichtigsten Strukturprotein im Weizen, führt (Rose, A. H. in Industrielle Mikrobiologie, Spektrum-der-Wissenschaft-Verlagsgesellschaft, 1987, 72–84). Entsprechende Gärverfahren werden auch auf andere Lebensmittel (Soja, Reis etc) angewendet. Obwohl diese bekannten Verfahren seit langem angewendet werden, sind sie mit dem Nachteil behaftet, daß die sich dabei vollziehende Qualitätsveränderung der Lebensmittel langsam und unvollständig abläuft.

Die Oxidoreduktase wird vorzugsweise in einer Menge von 1 ng/kg bis 1 mg/kg bzw. 1 ng/l bis 1 mg/l zugesetzt oder unmittelbar im Versuchsansatz von Mikroorganismen produziert und ausgeschieden, z. B. von Bakterien oder Hefen, welche die für die Enzyme kodierenden Gene auf Vektoren oder in der chromosomalen DNA enthalten. Die Oxidoreduktasen können sowohl aus eukaryontischen als auch aus prokaryontischen Organismen stammen. Als Enzyme zur Umlagerung bzw. Reduzierung von Disulfidbrücken in Lebensmittelproteinen werden gereinigte Oxidoreduktasen, deren Mutanten oder verwandte Enzyme benutzt. Von den Oxidoreduktasen werden besonders DsbA, DsbC, Thioredoxin und Glutaredoxin aus *Escherichia coli* bevorzugt, weil sie stabil und sehr effizient sind. Es können aber auch eukaryontische Enzyme wie Proteindisulfidisomerase (PDI) verwendet werden. Die prokaryontischen Enzyme können günstig erworben werden bzw. ohne großen Aufwand kloniert und somit rekombinant hergestellt werden. Die Grundzusammensetzung der zu bearbeitenden Lebensmittel entspricht der üblichen Praxis. So werden als Lieferanten für die Redoxäquivalente im allgemeinen Hefen bzw. Lactobacillen in üblichen Mengen benutzt, wobei aber auch andere geeignete Mikroorganismen zum Einsatz kommen können. Außerdem können mutierte Mikroorganismen Verwendung finden, die vermehrt Redoxäquivalente produzieren und ausscheiden.

Der pH-Wert liegt zweckmäßigerweise im gleichen Bereich wie bei der Herstellung ohne Oxidoreduktasen, wobei vor allem DsbA auch bei niedrigen pH-Werten eingesetzt werden kann (Wunderlich et al. (1993) Biochemistry 32, 12251–12256). Die Temperatur beträgt zwischen 4°C und 45°C. Ein Bereich zwischen Raumtemperatur und 37°C wird bevorzugt.

Die vorliegende Erfindung kann auf verschiedenste Bereiche der Lebensmittelherstellung Anwendung finden, da bei vielen Prozessen Mikroorganismen beteiligt sind und in nahezu allen Lebensmitteln Proteine enthalten sind, die wiederum disulfidverbrückt sind. Beispielhaft sind hier die Ausgangsmaterialien Weizenmehl (aber auch andere Getreidemehle), Reis und Sojabohnen mit den entsprechenden Produkten wie Brot, ang-kak, tempeh, natto, sufu usw. zu nennen. Selbst das in der Milch enthaltene Casein besitzt Disulfidbrücken, so daß auch hier das erfindungsgemäße Verfahren bei den verschiedensten Verfahren zur Verarbeitung von Milch (z. B. Joghurt- und Käseproduktion) angewendet werden kann.

Das nun folgende Beispiel erläutert die Erfindung.

Beispiel 1)

Verbesserung der Konsistenz von Brotteig durch Anwendung von Disulfid-Oxidoreduktasen

Es wurde ein Hefeteig hergestellt, der aus den handelsüblichen Zutaten Weizenmehl, Bäckerhefe und Wasser bestand. Zunächst wurde ein "Vorteig" aus etwa 75 g Mehl, 1 Hefewürfel (40 g), 1 g Zucker und ca. 30 ml Wasser gemischt und bei 37°C ca. 30 min "gehen" lassen. Anschließend wurden 20 g des Vorteigs für jeden Ansatz, nicht jedoch für den Nullwert, mit 100 g Mehl und 80 ml Wasser vermischt. Zu den Ansätzen 2, 3, 4 und 5 wurden je 0,5 mg Enzym gegeben (Ansatz 2) DsbA, 3) DsbC, 4) Glutaredoxin (Grx) und 5) Thioredoxin (Trx); alle Enzyme aus *E. coli*). Die Versuchsansätze wurden 60 Minuten bei 37°C inkubiert, wobei der Teig "ging".

Von jedem Ansatz wurden mehrere Proben à 2,5 g entnommen, in 10 mM HCl gelöst und mit Trichloressigsäure gefällt. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und das Pellet erneut in 10 mM HCl gelöst und anschließend mit Trichloressigsäure gefällt. Nach Wiederholung der Zentrifugation wurde das Pellet in Testpuffer (80 mM Na-phosphat pH 8,0, 0,5 mg/ml EDTA, 2% SDS) resuspendiert. Mit Ellmans Reagenz (DTNB, Dithio-bis-nitrobenzoesäure) wurde die Gesamtzahl der zugänglichen Cysteine bei 405 nm bestimmt (Tabelle 1).

Die Teigansätze, in die Enzym zugegeben worden war, gingen in der gleichen Zeit stärker als jener ohne Enzym.

Ergebnis: Beschaffenheit des Teiges nach der Gärung

Ansätze 2 bis 5) (mit Enzym): Teig ist nicht klebrig

Ansatz 1) (ohne Enzym): Teig ist klebrig und fädig.

Der Teig im Kontrollansatz 1) erreicht die vorteilhafte Beschaffenheit des Teiges der Ansätze mit Enzym erst nach dem Kneten. Das bedeutet, der Teig des Ansätze 2 bis 5 kann unmittelbar nach dem "Gehen" verarbeitet werden, der Arbeitsgang des Knetens entfällt also. Daraus folgt, daß die Disulfidbrücken durch die Anwendung von Enzymen schneller und effektiver reduziert bzw. umgelagert werden, d. h. es werden während des Gärvorgangs eine höhere Anzahl von Disulfidbrücken reduziert bzw. umgelagert. Dies trägt zur Verbesserung der Qualität des herzustellenden Brotes bzw. zur Möglichkeit, Mehl von minderwertigeren Getreidesorten verwenden zu können, bei.

Es leuchtet ein, daß dieses Beispiel auf andere Mikroorganismen, andere Redoxäquivalente, andere Substratproteine, auch nicht-Lebensmittelproteine, und andere Enzyme übertragen werden kann.

Tabelle 1

Ansatz	0	1	2	3	4	5
Vorteig zugegeben	/	ja	ja	ja	ja	ja
Enzym zugegeben	/	/	DsbA	DsbC	Grx	Trx
zugängliche Cysteine	100	303	474	435	458	465
(relative Anzahl im Vergleich zum unbehandelten Mehl)						

Patentansprüche

1. Verfahren zur enzymatischen Katalyse der Reduzierung und Umlagerung von Disulfidbrücken in Proteinen, wobei die Redoxäquivalente von Mikroorganismen bereitgestellt werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei als Enzyme Disulfid-Oxidoreduktasen verwendet werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei als Enzyme Thioredoxin, Glutaredoxin, DsbA oder DsbC aus *Escherichia coli* verwendet werden.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Substratprotein durch im Weizenmehl enthaltene Proteine repräsentiert wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Redoxäquivalente von *Saccharomyces cerevisiae* bereitgestellt werden.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Redoxäquivalente durch Gärung bereitgestellt werden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei Cystein als Redoxäquivalent wirkt.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei Glutathion als Redoxäquivalent wirkt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei Brotteig mit verbesserten Eigenschaften erhalten wird.

- Leerseite -